

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

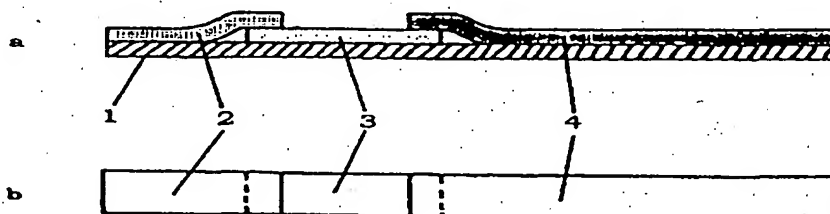
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/558, 33/543		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/18439
			(43) Date de publication internationale: 15 avril 1999 (15.04.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00147 (22) Date de dépôt international: 6 octobre 1998 (06.10.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700807 7 octobre 1997 (07.10.97) BE 9800485 25 juin 1998 (25.06.98) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UCB BIO-PRODUCTS, S.A. [BE/BE]; Allée de la Recherche 60, B-1070 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DEGELAEN, Jacques [BE/BE]; Avenue du Taillis 14, B-1470 Genappes (BE). FRERE, Jean-Marie [BE/BE]; Chemin de Sotrez 85, B-4550 Nantrin (BE). GRANIER, Benoît. [BE/BE]; Quai de la Régence 33, B-4130 Esneux (BE). JORIS, Bernard [BE/BE]; Chemin des Moutons 66, B-4900 Spa (BE). (74) Mandataire: ROELANTS, François; UCB, S.A.; Dépt. D.T.B., Rue d'Anderlecht 33, B-1620 Drogenbos (BE).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	

(54) Title: TESTING DEVICE FOR DETERMINING ANALYTES IN A LIQUID DAIRY PRODUCT

(54) Titre: DISPOSITIF D'ESSAI POUR LA DETERMINATION D'ANALYTES DANS UN PRODUIT LAITIER LIQUIDE



(57) Abstract

The invention concerns a testing device for determining analytes in a liquid dairy product by capillary migration of said dairy product, comprising a solid support (1) having a first and a second end, whereon are fixed, successively, starting from the first end: a membrane (2) for purifying the analysed liquid, a membrane (3) whereon one or several capturing substances are immobilised, and an absorbing membrane (4). The invention also concerns a method for detecting and quantifying analytes in a liquid dairy product by means of said testing device and a testing kit comprising said testing device.

(57) Abrégé

La présente invention se rapporte à un dispositif d'essai permettant de détecter la présence d'analytes dans un produit laitier liquide par migration capillaire dudit produit laitier, comprenant un support solide (1) qui possède une première et une seconde extrémité, sur lequel sont fixées, successivement, en partant de la première extrémité, une membrane (2) permettant la purification du liquide analysé, une membrane (3) sur laquelle une ou plusieurs substances de capture sont immobilisées, et une membrane (4) absorbante. Elle se rapporte également à un procédé permettant la détection et la quantification d'analytes dans un produit laitier liquide grâce à ce dispositif d'essai ainsi qu'à une trousse d'essai comprenant ce dispositif d'essai.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT..

AL	Albanie	RS	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

Dispositif d'essai pour la détermination d'analytes dans un produit laitier liquide.

La présente invention se rapporte à un dispositif d'essai pour la détermination d'analytes dans un produit laitier liquide tel que le lait. Elle concerne également un
5 procédé permettant la détection et la quantification d'analytes dans le lait grâce à ce dispositif d'essai ainsi qu'une trousse d'essai comprenant ce dispositif d'essai.

A l'heure actuelle, les exigences sanitaires de nombreux pays imposent de contrôler régulièrement la présence de diverses substances dans les produits laitiers, tels que médicaments vétérinaires et hormones, couramment utilisés dans l'élevage du
10 bétail. Pour des raisons médicales évidentes, ces substances doivent être évitées dans les produits laitiers destinés à la consommation humaine.

Dans d'autres cas, il est souhaitable de disposer de tests permettant de détecter la présence de substances endogènes dans le lait afin d'optimiser les pratiques d'élevage du bétail. En particulier, la détermination rapide du taux d'hormones dans
15 le lait permet d'identifier facilement les périodes propices à la reproduction.

Dans d'autres cas encore, on recherche des méthodes pratiques et fiables pour contrôler l'origine des produits laitiers dérivés des laits de diverses espèces animales. On recherche alors des méthodes qui permettraient d'identifier la présence de protéines caractéristiques du lait de certaines espèces par rapport à d'autres.

Par ailleurs, divers tests sont connus dans la littérature pour la détection d'analytes dans des liquides biologiques. Ces tests utilisent généralement des méthodes de détection faisant appel à un agent de reconnaissance (récepteur ou anticorps) qui reconnaît spécifiquement l'analyte ou un analogue de cet analyte, et à un agent de marquage (radioélément, enzyme, agent fluorescent, etc.) ci-après
20 dénommés réactifs de détection. En fonction des éléments choisis, on parlera de radioimmunoessai (RIA), de radiorécepteuressai (RRA), d'enzymeimmunoessai (EIA) etc. Dans leur principe général, ces tests font appel à la combinaison minimale des deux éléments précités (réactifs de détection) qui permettra d'obtenir un résultat dont la valeur est une indication de la quantité d'analyte présent.

Il convient de remarquer qu'en fonction de la méthode de détection choisie, l'agent de marquage peut être couplé soit à l'agent de reconnaissance soit à l'analyte ou à une substance analogue de l'analyte du point de vue de sa reconnaissance par l'agent de reconnaissance. Il existe également des procédés dans lesquels l'agent de reconnaissance ou l'analyte ou la substance analogue de l'analyte contient
35 intrinsèquement l'agent de marquage (par exemple un analyte marqué radi activement).

détection d'analytes dans les produits laitiers liquides, les méthodes recherchées devant permettre la détermination fiable de différents types d'analytes, de préférence au moment de la collecte à la ferme. La demanderesse a donc recherché une méthode qui permette très rapidement d'obtenir un résultat fiable et sensible en un nombre
5 limité d'étapes simples, ne requérant pas de savoir-faire expérimental particulier. En outre, la demanderesse a recherché une méthode fournissant un résultat facilement détectable visuellement et pouvant en outre faire l'objet d'une quantification par mesure instrumentale.

La demanderesse vient maintenant de découvrir que ces objectifs peuvent être
10 atteints grâce à l'utilisation d'un nouveau dispositif d'essai permettant de déterminer aisément la présence d'analytes dans les produits laitiers liquides, en particulier, le lait.

C'est pourquoi la présente invention concerne un dispositif d'essai permettant de détecter la présence d'analytes dans un produit laitier liquide par migration capillaire tangentielle dudit produit laitier. Le dispositif d'essai selon l'invention comprend un
15 support solide (1) qui possède une première et une seconde extrémité, sur lequel sont fixées, successivement, en partant de la première extrémité,

- une membrane (2) permettant la purification du liquide analysé,
- une membrane (3) sur laquelle une ou plusieurs substances de capture sont
20 immobilisées, et
- une membrane (4) absorbante,

caractérisé en ce que la membrane (2) est capable de retenir les substances présentes dans le produit laitier, qui empêchent la migration sur le dispositif d'essai des analytes éventuellement présents dans le produit laitier et des réactifs de détection utilisés
25 selon la méthode pratiquée, et ce, lors de la migration capillaire tangentielle de l'échantillon après trempage de la première extrémité du dispositif d'essai dans le produit laitier analysé.

Selon un mode d'implémentation particulier de l'invention, le dispositif d'essai selon la présente invention possède en outre une membrane (5) sur laquelle au moins
30 un réactif de détection a été déposé, ce réactif de détection étant capable de se solubiliser rapidement en présence dudit produit laitier. Selon ce mode d'implémentation particulier, la membrane (5) doit être située avant la membrane (3). Elle peut être située, par exemple, soit avant la membrane (2) à la première extrémité du dispositif, soit entre la membrane (2) et la membrane (3) ou encore en dessous ou
35 au dessus de la membrane (2).

Les différentes membranes présentes dans le dispositif d'essai selon la présente invention se superposent à leurs extrémités de manière à assurer la migration continue du produit laitier d'une zone à l'autre. De préférence, la membrane (3) est

placée de manière à ce que son extrémité proximale soit placée en dessous de la membrane (2) et son extrémité distale en dessous de la membrane (4). Les membranes peuvent éventuellement être maintenues en contact les unes avec les autres grâce à un film plastique adhésif (6). Dans ce cas, le film plastique adhésif est choisi de manière à ne pas affecter la migration du liquide sur le dispositif d'essai.

L'option de couvrir le dispositif d'essai par un film plastique adhésif présente deux avantages: il assure un contact parfait à la superposition des membranes et constitue un film protecteur. Le film plastique adhésif (6) peut soit recouvrir complètement les membranes (2), (3), (4) et (5), soit recouvrir partiellement les membranes individuelles. De préférence, le film plastique adhésif (6) ne recouvre pas les premiers millimètres de la première extrémité de manière à permettre une migration plus rapide du liquide sur la membrane (2) du dispositif d'essai.

Les Figures 1 à 3 illustrent des exemples de dispositifs d'essai selon la présente invention. Les Figures 1a, 2 et 3 présentent des vues frontales et la Figure 1b présente une vue en section longitudinale.

Le support solide (1) présent dans le dispositif d'essai selon la présente invention est en verre ou en matière plastique, de préférence, en matière plastique. Dans le cas d'un support en matière plastique, son épaisseur est généralement comprise entre 0,05 et 1 mm, de préférence entre 0,1 et 0,6 mm. Les membranes sont fixées sur le support solide (1) grâce à un adhésif.

La membrane (2) peut être de différents types. D'une part, elle doit être capable de retenir les substances présentes dans le produit laitier qui empêchent la migration sur le dispositif d'essai des analytes éventuellement présents dans le produit laitier et des réactifs de détection utilisés selon la méthode pratiquée. D'autre part, elle doit permettre la migration rapide des analytes et réactifs de détection sur le dispositif d'essai, tout en préservant l'activité de ces analytes et réactifs de détection lors de cette migration. Des exemples non limitatifs de membranes permettant d'obtenir ce résultat sont Cytosep 1663 et Leukosorb LK4 (disponibles chez Pall Gelman Sciences), GF/D, GF/DVA, 17CHR (disponibles chez Whatmann) et fibre de verre de type GF141 (disponible chez Alstrom).

La membrane Leukosorb utilisée de préférence est une membrane fabriquée à partir de fibres de polyester non tissées, destinée à la rétention de leukocytes à partir d'échantillons cliniques issus du sang, de l'urine, de la salive et du liquide cérébro-spinal. La rétention des leukocytes est réalisée par filtration du fluide, par passage transversal à travers la membrane.

La demanderesse a découvert de façon inattendue que ces types de membranes permettent également d'assurer une fonction très importante pour la détection d'analytes dans un produit laitier grâce aux dispositifs d'essai selon la présente

substance de capture permet de compléter les informations quantitatives fournies par les substances de capture précédentes.

La détermination d'une fixation sur la membrane (3) (étape c) du procédé s'effectue simplement en déterminant la présence de Marqueurs dans cette zone.

- 5 Cette détermination est possible simplement visuellement. Toutefois, si l'on désire avoir une mesure précise de l'intensité des signaux observés, on peut avoir recours à un appareil capable de mesurer l'intensité du signal observé. Lorsqu'on utilise une Référence, elle est fixée par une substance de capture spécifique qui fournit une référence interne pour la mesure de l'intensité des signaux observés.

- 10 L'interprétation du résultat obtenu dépend de la méthode de détection pratiquée, à savoir, des réactifs de détection et substances de capture utilisées.

- Par rapport aux procédés de détection d'analytes dans le lait précédemment décrits dans la littérature, le procédé selon la présente invention présente les avantages suivants. En premier lieu, ce procédé est très rapide et extrêmement simple
15 à mettre en oeuvre: il comporte essentiellement deux étapes de manipulation aisée, ne requérant pas de savoir-faire expérimental particulier. Ensuite, l'appréciation qualitative et quantitative du résultat est immédiate et ne nécessite pas d'opérations supplémentaires particulières, telles que celles requises lorsque la détection est effectuée par des colorants et/ou marqueurs enzymatiques. En outre, ce procédé est
20 directement applicable pour la détection de différents types d'analytes. Enfin, dans le mode d'implémentation utilisant une Référence, le résultat est directement interprétable et quantifiable, sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à un ou plusieurs tests de référence.

- La présente invention concerne aussi une trousse d'essai pour la détection
25 d'analytes dans un produit laitier comprenant un dispositif d'essai selon la présente invention. Le cas échéant, la trousse d'essai selon la présente invention peut également contenir les réactifs de détection à ajouter à l'échantillon avant la mise en contact du produit laitier avec le dispositif d'essai.

- 30 Les exemples qui suivent illustrent différents aspects et modes d'implémentation de la présente invention sans toutefois en limiter sa portée.

Exemple 1. Fabrication des dispositifs d'essai. Modes opératoires généraux.

- 35 1.1. Assemblage de cartes membranaires.

Des cartes ayant une taille de 300 x 76,2 mm sont d'abord assemblées au moyen d'un lamineur de type Chlamshell Laminator (disponible chez Bio Dot, Inc.) selon la méthode suivante:

On découpe un rectangle de support plastique de type ArCare 8565 (disponible chez Adhesive Research) de dimension 300 x 76,2 mm (support solide (1)). On découpe ensuite un rectangle de membrane Leukosorb LK4 (disponible chez Pall Gelman Sciences) de dimension 300 x 20 mm (membrane (2)), un rectangle de membrane Hi-Flow SX (disponible chez Millipore) de dimension 300 x 25 mm (membrane (3)), un rectangle de membrane de cellulose 3 mm (disponible chez Whatmann) de dimension 300 x 40 mm (membrane (4)) et un rectangle de membrane Accuwick (disponible chez Pall Gelman Sciences) de dimension 300 x 0,8 mm (membrane (5)).

On loge successivement les membranes (2) et (4), puis (5), puis (3) dans un emplacement spécifique du moule inférieur du laminateur. Le support solide (1) recouvert d'adhésif est quant à lui maintenu dans le couvercle de l'appareil, le côté adhésif étant exposé à l'air. Les membranes logées dans le moule inférieur sont mises en contact avec le support adhésif en refermant le laminateur; les membranes sont maintenues exactement en place au moyen d'une succion d'air réalisée par une pompe à vide. Lorsque le vide est rompu, on récupère une carte constituée du support solide (1) sur lequel les membranes (2), (3), (4) et (5) sont fixées.

1.2. Dépôt des substances de capture sur la membrane (3).

Le dépôt des substances de capture sur la membrane (3) est effectué avant ou après l'assemblage selon l'exemple 1.1.

On prépare une solution aqueuse contenant la substance de capture. Elle est déposée sur la membrane (3) de la carte membranaire préparée à l'exemple 1.1. au moyen d'un "Dispenser" de type X-Y Platform Biojet Quanti-3000 de Bio Dot, Inc.

Les solutions déposées sont immédiatement évaporées en plaçant l'ensemble de la carte pendant une minute sous un air pulsé chaud à 60°C.

1.3. Dépôt de la substance de marquage sur la membrane (5).

a) Avant l'assemblage selon l'exemple 1.1.

On prépare une solution aqueuse contenant la substance de marquage. La membrane (5) est immergée dans cette solution. Elle est ensuite égouttée, puis séchée une nuit à température ambiante sous un vide de 0,5 bar.

b) Après l'assemblage selon l'exemple 1.1.

On procède selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.2. pour le dépôt des substances de capture.

1.4. Dépôt du film plastique adhésif (6).

On découpe un rectangle de film adhésif du type ArCare 7759 (disponible chez Adhesive Research) de dimension 300 x 20 mm pour un recouvrement partiel, et 300 x 71.2 mm pour un recouvrement de toutes les membranes.

La carte obtenue selon l'exemple 1.1. est placée dans le moule inférieur d'un laminateur et le film adhésif est placé dans le couvercle du laminateur, le côté adhésif étant exposé à l'air. Le film plastique adhésif est mis en contact avec la carte membranaire lors de la fermeture de l'appareil.

1.5. Découpe en lamelles.

Les cartes obtenues après assemblage sont découpées en lamelles à l'aide d'un appareil de type guillotine ou à l'aide d'un appareil rotatif (disponible chez Bio Dot, Kinematic ou Alkzo). Les lamelles des extrémités sont écartées, les autres lamelles étant prêtes à l'emploi.

Pour leur conservation, les dispositifs d'essai sont placés dans un récipient opaque et hermétique en présence d'un agent dessicant (Silgelac, France).

1.6. Présentation dans un carter plastique.

On place le dispositif d'essai dans un boîtier plastique qui présente deux ouvertures: la première, en forme de cuvette, est placée juste au-dessus de la membrane (2), et permet de recevoir le liquide à analyser; la seconde est une fenêtre d'ouverture permettant de visualiser le résultat sur la membrane (3).

Exemple 2. Détection d'antibiotiques à noyaux β -lactame dans le lait au moyen de l'enzyme R39.

2.1. Identifiant.

L'identifiant utilisé dans cet exemple est La D-alanyl-D-alanine-carboxypeptidase exocellulaire soluble produite par Actinomadura R39 obtenue selon le mode opératoire décrit dans J.-M. FRERE et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 18(4), 506-510 (1980).

2.2. Couplage de l'identifiant au Marqueur.

2.2.1. Biotinylation de l'identifiant.

250 μ l d'une solution aqueuse d'enzyme R39 à 1 mg/ml sont dialysés pendant 24 heures contre 500 ml de tampon HNM (Hepes 10 mM, pH 8, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM). On ajoute alors à cette solution d'enzyme R39 dialysée, 2 ml de tampon bicarbonate (0,1 M en bicarbonate de sodium, pH 9) et 250 μ l d'une solution d'ester 6-(biotinamido)caproïque de N-hydroxy-succinimide à 5 mg/ml dans de la DMF anhydre. Cette solution est agitée doucement sur agitateur pour tubes sur axe rotatif de type

LABINCO (disponible chez VEL, Belgique) à une vitesse de 2 tours/minute pendant 3 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution ainsi obtenue est dialysée contre du tampon HNM (Hepes 100 mM; pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) pendant 24 heures. De cette manière, on obtient une solution d'enzyme R39 biotinylée que l'on dilue dans du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM; pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 250 mM, BSA 10 mg/ml) jusqu'à une concentration de 100 µg d'enzyme R39 par ml de tampon. Cette solution est stockée à -20°C.

2.2.2. Marqueur.

Comme Marqueur, on utilise des particules d'or ayant un diamètre de 40 nm, sur lesquelles un anticorps de chèvre anti-biotine a été déposé sous la forme de suspensions dans une solution aqueuse de tétraborate de sodium à 2 mM à pH 7,2, stabilisée par de l'azoture de sodium à 0,1% (disponible chez BRITISH BIOCELL (Réf. GAB40). La densité optique de ces suspensions à 520 nm est d'environ 10 et la concentration en protéine est d'environ 24 µg/ml.

2.2.3. Couplage de l'Identifiant biotinylé au Marqueur.

Solution A pour test rapide

La solution d'enzyme R39 biotinylée préparée à l'exemple 2.2.1. est diluée 25 fois par du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 250 mM, BSA 10 mg/ml). On mélange à température ambiante 17,5 parties en volume de cette solution diluée d'enzyme R39 biotinylée, 9,27 parties en volume de suspension de particules d'or servant à marquer l'enzyme R39 et 6 parties en volume de suspension de particules d'or de référence (voir exemple 2.3).

Solution B pour test sensible

La solution d'enzyme R39 biotinylée préparée à l'exemple 2.2.1. est diluée 50 fois par du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 250 mM, BSA 10 mg/ml). On mélange à température ambiante 17,5 parties en volume de cette solution diluée d'enzyme R39 biotinylée, 9,27 parties en volume de suspension de particules d'or servant à marquer l'enzyme R39 et 6 parties en volume de suspension de particules d'or de référence (voir exemple 2.3).

2.3. Référence

Comme Référence, on utilise des particules d'or de 40 nm sur lesquelles un anticorps de chèvre anti-Immoglobuline de lapin a été déposé. Ces particules sont disponibles chez BRITISH BIOCELL (Réf. GAR40), sous la forme de suspensions dans une solution aqueuse de tétraborate de sodium à 2 mM à pH 7,2, stabilisée par de

l'azoture de sodium à 0,1%. La densité optique de ces suspensions à 520 nm est d'environ 3 et la concentration en protéine est d'environ 6 µg/ml.

2.4. Substances de capture.

5 2.4.1. Première substance de capture.

8 ml d'une solution contenant 213 mg de Gamma Globuline Humaine (G4386, Sigma) et 8,6 mg de chlorhydrate de 2-liminothiolane (Aldrich, 33056-6) dans du tampon carbonate de sodium (100 mM, pH9) sont incubés pendant une heure à 25°C.

10 Par ailleurs, 20 ml d'une solution contenant 119,8 mg de céphalosporine-C et 54 mg de sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (sSMCC, 22322 Pierce) dans du tampon carbonate de sodium (100 mM, pH9) sont incubés pendant une heure à 25°C.

15 Les deux solutions préparées précédemment sont ensuite mélangées. On ajuste le pH de la solution résultante à 7,1 par ajout de 3 ml NaH_2PO_4 500 mM et l'on incube pendant deux heures à 25°C. Le mélange obtenu après incubation est dialysé trois fois contre 1 litre de tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7,5). La solution résultante est filtrée sur un filtre à 0,22 µm, puis elle est aliquotée et congelée à -20°C jusqu'à utilisation.

20 Lors de l'utilisation, les aliquots sont décongelés, et on y ajoute un colorant alimentaire avant d'effectuer le dépôt sur la membrane afin d'apprécier à tout moment la position exacte du dépôt et la qualité du trait.

La première substance de capture permet de fixer les Identifiants couplés aux Marqueurs libres excédentaires par rapport à la quantité d'antibiotique présent dans l'échantillon.

25

2.4.2. Deuxième substance de capture.

Pour la deuxième substance de capture, on utilise une solution d'immunoglobuline de lapin (Sigma I 5006) à une concentration de 0,5 mg/ml en immunoglobuline dans du tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,5, gamma globuline humaine 5 mg/ml. Cette seconde substance de capture arrête la Référence lors de la migration du liquide sur le dispositif d'essai.

30

2.5. Dispositif d'essai.

On utilise des dispositifs d'essai contenant les membranes (2), (3) et (4), 35 assemblés selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.1. La membrane (3) de ces dispositifs porte du côté proximal la substance de capture décrite à l'exemple 2.4.1. et du côté distal la substance de capture décrite à l'exemple 2.4.2. Les substances de capture ont été déposées selon le procédé décrit à l'exemple 1.2.

2.5.1. Test 1 - Test rapide

On prépare sept échantillons de lait contenant respectivement 0; 2; 4; 5; 6; 8 et 10 ppb de pénicilline G. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante.

On prélève un aliquot de 200 µl d'échantillon de lait et 32,8 µl de solution A préparée à l'exemple 2.2.3. que l'on place dans un tube Eppendorf. Ce mélange est incubé pendant 3 minutes à 47°C. On place ensuite un dispositif d'essai verticalement dans le tube Eppendorf de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 1 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 7 échantillons testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande de détection est inversement proportionnelle à la quantité de pénicilline G présente dans l'échantillon.

Tableau 1

Pénicilline G (ppb)	Intensité	
	1ère bande	2ème bande
0	10	6
2	8	6
4	5	6
5	3	6
6	2	6
8	1	6
10	0	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle de la bande de référence, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés dans le Tableau 1 montrent que ce test permet de détecter en 5 minutes jusqu'à 4 ppb de pénicilline G dans un échantillon de lait.

2.5.2. Test 2 - Test sensible.

On prépare six échantillons de lait contenant respectivement 0; 2; 2,5; 3; 4 et 5 ppb de pénicilline G. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante.

On prélève un aliquot de 200 µl d'échantillon de lait et 32,8 µl de solution B préparée à l'exemple 2.2.3. que l'on place dans un tube Eppendorf. Ce mélange est incubé pendant 5 minutes à 47°C. On place ensuite un dispositif d'essai verticalement dans le tube Eppendorf de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 2 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 7 échantillons testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande de détection est inversement proportionnelle à la quantité de pénicilline G présente dans l'échantillon.

Tableau 2

15	<u>Pénicilline G</u>	<u>Intensité</u>	
	<u>(ppb)</u>	<u>1ère bande</u>	<u>2ème bande</u>
	0	10	6
	2	7	6
	2,5	5	6
20	3	4	6
	4	1	6
	5	0	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle de la bande de référence, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés dans le Tableau 2 montrent que ce test permet de détecter en 7 minutes jusqu'à 2,5 ppb de pénicilline G dans un échantillon de lait.

Exemple 3. Détermination d'antibiotiques à noyau β -lactame dans le lait au moyen de BlaR.

Cet exemple illustre la détection dans le lait d'antibiotiques à noyau β -lactame contrôlés par les autorités sanitaires. Le test décrit dans cet exemple utilise le récepteur BlaR-CTD couplé à des billes d'or qui servent d'agents de marquage et utilise un support se présentant sous la forme d'un dispositif d'essai comprenant un support solide sur lequel des membranes sont fixées.

3.1. Couplage de BlaR-CTD (Identifiant) aux billes d'or (Marqueur).

3.1.1. Biotinylation de BlaR-CTD.

3,79 ml d'une solution d'agent de reconnaissance BlaR-CTD à 6.6 mg/ml sont repris en tampon Phosphate de sodium 20 mM pH 7. On ajoute alors à cette solution de BlaR-CTD 41,71 ml de tampon bicarbonate (0.1 M en bicarbonate de sodium, pH 9) et 2 ml d'une solution d'ester 6-(biotinamido)caproïque de N-hydroxy-succinimide à 2,23 mg/ml également en tampon bicarbonate. Cette solution est agitée doucement sur agitateur pour tubes sur axe rotatif de type LABINCO (disponible chez VEL, Belgique) à une vitesse de 2 tours/minute pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. 2,5 ml d'une solution de tampon Tris 1 M pH 8 sont incubés avec le mélange réactionnel dans les mêmes conditions pendant 30 minutes. La solution ainsi obtenue est dialysée contre du tampon HNM (Hepes 100mM, pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) pendant 24 heures. De cette manière, on obtient une solution de BlaR-CTD biotinylé que l'on dilue dans du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 250 mM, BSA 10 mg/ml) jusqu'à une concentration de 250 µg de BlaR-CTD biotinylé par ml de tampon. Cette solution est stockée à -20 °C.

15

3.1.2. Agent de marquage.

Comme agent de marquage, on utilise des particules d'or ayant un diamètre de 40 nm, sur lesquelles un anticorps de chèvre anti-biotine a été déposé sous la forme de suspensions dans une solution aqueuse de tétraborate de sodium à 2 mM à pH 7,2, stabilisée par de l'azoture de sodium à 0,1% (disponible chez BRITISH BIOCELL (Réf. GAB40). La densité optique de ces suspensions à 520 nm est d'environ 10 et la concentration en protéine est d'environ 24 µg/ml.

20

3.1.3. Couplage de BlaR-CTD biotinylé aux billes d'or.

La solution de BlaR-CTD biotinylé préparée à l'exemple 3.1.1 est diluée 114,7 fois par du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 250 mM, BSA 10 mg/ml). On mélange à température ambiante 22,5 parties en volume de cette solution diluée de BlaR-CTD biotinylé, 7,5 parties en volume de tampon HNM-BSA, 9,27 parties en volume de suspension de particules d'or servant à marquer BlaR-CTD biotinylé et 6 parties en volume de suspension de particules d'or de référence (voir exemple 3.1.4 ci-dessous).

25

30

3.1.4. Référence indépendante.

Dans ce test, on utilise également une substance de référence qui fournit une bande dont l'intensité permet de quantifier rapidement la quantité d'antibiotique présent dans l'échantillon.

35

Pour cela, on utilise des particules d'or de 40 nm sur lesquelles un anticorps de chèvre anti-Immunoglobuline de lapin a été déposé. Ces particules sont disponibles

chez BRITISH BIOCELL (Réf. GAR40), sous la forme de suspensions dans une solution aqueuse de tétraborate de sodium à 2 mM à pH 7,2, stabilisée par de l'azoture de sodium à 0,1%. La densité optique de ces suspensions à 520 nm est d'environ 3 et la concentration en protéine est d'environ 6 µg/ml.

5

3.2. Substances de capture

3.2.1. Première substance de capture - Antibiotique de référence.

8 ml d'une solution contenant 213 mg de Gamma Globuline Humaine (G4386, Sigma) et 8,6 mg de chlorhydrate de 2-Iminothiolane (Aldrich, 33056-6) dans du tampon carbonate de sodium (100 mM, pH 9) sont incubés pendant une heure à 25°C.

10

Par ailleurs, 20 ml d'une solution contenant 119,8 mg de céphalosporine-C et 54 mg de sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (sSMCC, 22322 Pierce) dans du tampon carbonate de sodium (100 mM, pH 9) sont incubés pendant une heure à 25°C.

15

Les deux solutions préparées précédemment sont ensuite mélangées. On ajuste le pH de la solution résultante à 7,1 par ajout de 3 ml NaH_2PO_4 500 mM et l'on incube pendant deux heures à 25°C. Le mélange obtenu après incubation est dialysé trois fois contre 1 litre de tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7,5). La solution résultante est filtrée sur un filtre à 0,22 µm, puis elle est aliquotée et congelée à -20°C jusqu'à utilisation.

20

Lors de l'utilisation, les aliquotes sont décongelées, et on y ajoute un colorant alimentaire avant d'effectuer le dépôt sur la membrane afin d'apprécier à tout moment la position exacte du dépôt et la qualité du trait.

La première substance de capture permet de fixer BlaR-CTD couplé aux billes d'or présent en excédent par rapport à la quantité d'antibiotique présent dans l'échantillon.

25

3.2.2. Deuxième substance de capture - Substance capable de fixer la référence indépendante.

30

Pour la deuxième substance de capture, on utilise une solution d'immunoglobuline de lapin (Sigma I 5006) à une concentration de 0,5 mg/ml en immunoglobuline dans du tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,5, gamma globuline humaine 5 mg/ml. Cette seconde substance de capture arrête la référence indépendante lors de la migration du liquide sur le dispositif d'essai.

35

3.3 Dispositif d'essai.

On utilise des dispositifs d'essai contenant les membranes (2), (3) et (4), assemblés selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.1. La membrane (3) de ces

dispositifs porte du côté proximal la substance de capture décrite à l'exemple 3.2.1. et du côté distal la substance de capture décrite à l'exemple 3.2.2. Les substances de capture ont été déposées selon le procédé décrit à l'exemple 1.2.

5 3.4. Détermination des antibiotiques dans le lait.

3.4.1. Test en 3 minutes - Test rapide

On prépare 7 échantillons de lait frais contenant respectivement 0:1:2:3:4:5 et 6 ppb de pénicilline G. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante :

- 10 On prélève un aliquot de 200 µl d'échantillon de lait et 45.27 µl de solution préparée à l'exemple 3.1.3 que l'on place dans une fiole en verre. Ce mélange est incubé pendant 1 minute à 47°C. On prend un dispositif d'essai que l'on place verticalement dans la fiole en verre de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange et de manière à ce que la seconde
- 15 extrémité repose sur la paroi de la fiole en verre. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 1 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 7 échantillons testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour

20 la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur de 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande est inversement proportionnelle à la quantité de Pénicilline G présente dans l'échantillon.

Tableau 1

	<u>Pénicilline G</u>	<u>Intensité</u>	
	<u>(ppb)</u>	<u>1ère bande</u>	<u>2ème bande</u>
25	0	10	6
	1	9	6
	2	9	6
	3	4	6
30	4	0	6
	5	0	6
	6	0	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle

35 de la deuxième bande, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés dans le Tableau 1 montrent que ce test permet de détecter en 3 minutes moins de 4 ppb de pénicilline G dans un échantillon de lait.

Des essais ont également été réalisés avec d'autres antibiotiques à noyau β -lactame dans les mêmes conditions. Ce test réalisé en 3 minutes permet de détecter l'amoxicilline jusqu'à 5 ppb, l'ampicilline jusqu'à 5 ppb, la cloxacilline à moins de 10 ppb, la dicloxacilline à moins de 20 ppb, l'oxacilline à moins de 20 ppb et la céphapirine jusqu'à 20 ppb dans un échantillon de lait.

1.3.2. Test en 5 minutes

On prépare 6 échantillons de lait frais contenant respectivement 0:2:4:6:8 et 10 ppb de cloxacilline. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante.

On prélève un aliquot de 200 μ l d'échantillon de lait et 45.27 μ l de solution préparée à l'exemple 3.1.3 que l'on place dans une fiole en verre. Ce mélange est incubé pendant 3 minutes à 47°C. On prend un dispositif d'essai que l'on place verticalement dans la fiole en verre de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange et de manière à ce que la seconde extrémité repose sur la paroi de la fiole en verre. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 2 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 6 échantillons testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur de 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande est inversement proportionnelle à la quantité de Cloxacilline présente dans l'échantillon.

Tableau 2

Cloxacilline (ppb)	Intensité	
	1ère bande	2ème bande
0	10	6
2	6	6
4	5	6
6	3	6
8	3	6
10	3	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle de la deuxième bande, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés dans le Tableau 2 montrent que ce test permet de détecter en 5 minutes jusqu'à 4 ppb de cloxacilline dans un échantillon de lait.

Des essais ont également été réalisés avec d'autres antibiotiques à noyau β -lactame dans les mêmes conditions. Ce test réalisé en 5 minutes permet de détecter la pénicilline G jusqu'à 3 ppb, l'amoxicilline jusqu'à 4 ppb, l'ampicilline jusqu'à 4 ppb, la dicloxacilline jusqu'à 8 ppb, l'oxacilline jusqu'à 8 ppb, la céphapirine jusqu'à 16 ppb, le ceftiofur jusqu'à 100 ppb, la cefquinone à moins de 20 ppb, la nafcilline jusqu'à 20 ppb et la céfazoline jusqu'à 60 ppb dans un échantillon de lait.

Ce test convient particulièrement bien comme test de tri avant le dépotage des camions de lait dans les silos.

10 1.3.3. Test en 9 minutes

On prépare 6 échantillons de lait frais contenant respectivement 0;4;6;8;10 et 12 ppb de céphapirine. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante.

On prélève un aliquot de 200 μ l d'échantillon de lait et 45.27 μ l de solution préparée à l'exemple 3.1.3 que l'on place dans une fiole en verre. Ce mélange est incubé pendant 7 minutes à 47°C. On prend un dispositif d'essai que l'on place verticalement dans la fiole en verre de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange et de manière à ce que la seconde extrémité repose sur la paroi de la fiole en verre. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 3 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 6 échantillons testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur de 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande est inversement proportionnelle à la quantité de Céphapirine présente dans l'échantillon.

Tableau 3

	<u>Céphapirine</u>	<u>Intensité</u>	
	<u>(ppb)</u>	<u>1ère bande</u>	<u>2ème bande</u>
30	0	10	6
	4	6	6
	6	5	6
	8	4	6
	10	3	6
35	12	3	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle de la deuxième bande, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés

dans le Tableau 3 montrent que ce test permet de détecter en 9 minutes jusqu'à 6 ppb de céphapirine dans un échantillon de lait.

Des essais ont également été réalisés avec d'autres antibiotiques à noyau β -lactame dans les mêmes conditions. Ce test réalisé en 9 minutes permet de détecter

5 la pénicilline G jusqu'à 3 ppb, l'amoxicilline jusqu'à 4 ppb, l'ampicilline jusqu'à 4 ppb, la cloxacilline jusqu'à 4 ppb, la dicloxacilline à moins de 8 ppb, l'oxacilline à moins de 8 ppb, le ceftiofur jusqu'à 80 ppb, la cefquinone à moins de 20 ppb, la nafcilline à moins de 20 ppb et la céfazoline jusqu'à 45 ppb dans un échantillon de lait.

Ce test réalisé en 9 minutes permet donc de détecter tous les antibiotiques

10 contrôlés actuellement par les autorités européennes, et ce, jusqu'aux limites légales imposées par ces autorités.

1.3.4. Test en 20 minutes

On prépare 6 échantillons de lait frais contenant respectivement 0;20;30;40;50

15 et 60 ppb de ceftiofur. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante.

On prélève un aliquot de 200 μ l d'échantillon de lait et 45.27 μ l de solution préparée à l'exemple 3.1.3 que l'on place dans une fiole en verre. Ce mélange est incubé pendant 18 minutes à 47°C. On prend un dispositif d'essai que l'on place

20 verticalement dans la fiole en verre de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange et de manière à ce que la seconde extrémité repose sur la paroi de la fiole en verre. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 4 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 6 échantillons

25 testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur de 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande est inversement proportionnelle à la quantité de Ceftiofur présente dans l'échantillon.

Tableau 4

<u>Ceftiofur</u> (ppb)	<u>Intensité</u>	
	<u>1ère bande</u>	<u>2ème bande</u>
0	10	6
20	6	6
30	5	6
40	4	6
50	3	6
60	3	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle de la deuxième bande, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés dans le Tableau 4 montrent que ce test permet de détecter en 20 minutes jusqu'à 30 ppb de ceftiofur dans un échantillon de lait.

Ce test en 20 minutes permet donc de détecter en un seul test tous les antibiotiques contrôlés actuellement par les autorités européennes et américaines, et ce, jusqu'aux limites légales imposées par ces autorités.

Exemple 4. Utilisation d'un dispositif d'essai dans un carter plastique.

On utilise un dispositif d'essai tel que décrit à l'exemple 1.6. Dans ce cas, la mise en contact de l'échantillon avec le dispositif d'essai s'effectue en déposant le mélange incubé dans l'ouverture en forme de cuvette prévue à cet effet.

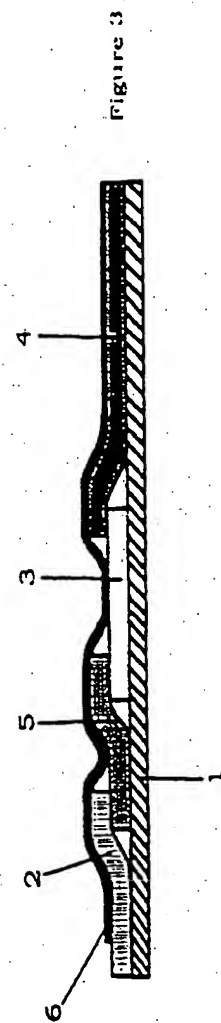
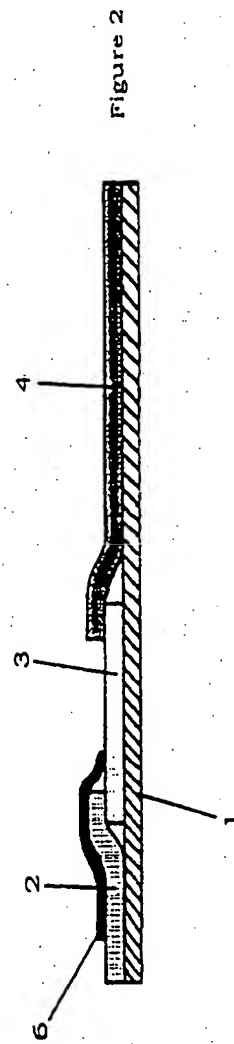
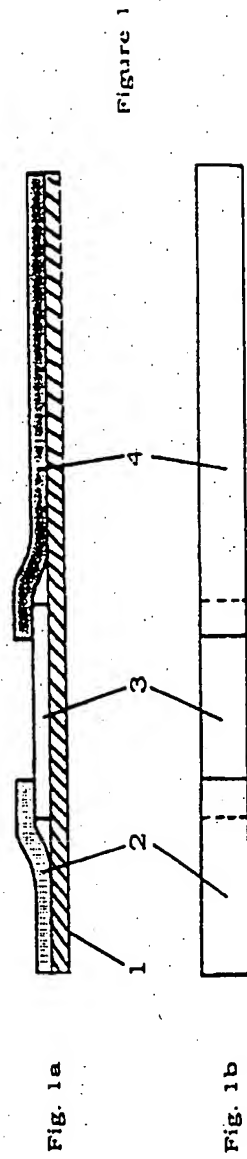
REVENDICATIONS

1. Dispositif d'essai permettant de détecter la présence d'analytes dans un produit laitier liquide par migration capillaire tangentielle dudit produit laitier, comprenant un support solide (1) qui possède une première et une seconde extrémité, sur lequel sont fixées, successivement, en partant de la première extrémité,
- une membrane (2) permettant la purification du liquide analysé,
 - une membrane (3) sur laquelle une ou plusieurs substances de capture sont immobilisées, et
 - une membrane (4) absorbante,
- caractérisé en ce que la membrane (2) est capable de retenir les substances présentes dans le produit laitier, qui empêchent la migration sur le dispositif d'essai des analytes éventuellement présents dans le produit laitier et des réactifs de détection utilisés selon la méthode pratiquée, et ce, lors de la migration capillaire tangentielle de l'échantillon après trempage de la première extrémité du dispositif d'essai dans le produit laitier analysé.
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la membrane (2) est la membrane Leukosorb.
3. Dispositif d'essai selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il possède en outre une membrane (5) sur laquelle au moins un réactif de détection a été déposé, la membrane (5) étant située avant la membrane (3).
4. Dispositif d'essai selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les membranes sont recouvertes complètement ou partiellement par un film plastique adhésif (6).
5. Dispositif d'essai selon la revendication 4, caractérisé en ce que le film plastique (6) ne recouvre pas les premiers millimètres du dispositif d'essai.
6. Dispositif d'essai selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est placé dans un boîtier plastique présentant une ouverture en forme de cuvette au-dessus de la membrane (2) et une fenêtre d'ouverture au-dessus de la membrane (3).

7. Procédé pour la détection d'analytes dans un produit laitier liquide, utilisant un dispositif d'essai selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ainsi que des réactifs de détection, comprenant les étapes suivantes:
- a) la mise en contact d'un volume déterminé de produit laitier avec le dispositif d'essai selon la présente invention, cette mise en contact ayant lieu à la première extrémité du dispositif d'essai,
 - b) la migration tangentielle par capillarité du produit laitier sur le dispositif d'essai de manière à ce que les analytes et les réactifs de détection éventuellement présents dans le produit laitier passent progressivement sur la membrane (2), puis la membrane (3), et de manière à ce que les constituants du produit laitier qui ne sont pas arrêtés par les membranes (2) et (3) aboutissent dans la membrane (4), et
 - c) la détermination d'une fixation sur la membrane (3).
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les réactifs de détection comprennent au moins une substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de cet analyte et au moins un agent de marquage.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'au moins une substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de cet analyte est couplée à au moins un agent de marquage.
10. Procédé selon les revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'agent de marquage est fluorescent, particulaire, radioactif, luminescent ou enzymatique.
11. Procédé selon les revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'au moins un réactif de détection est ajouté avant l'étape a).
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le mélange préparé avant l'étape a) est maintenu dans des conditions d'incubation permettant à l'un des réactifs de détection de former un complexe stable et essentiellement irréversible avec l'analyte ou une substance analogue de cet analyte.
13. Procédé selon les revendications 8 à 12, caractérisé en ce que les réactifs de détection comprennent en outre au moins une substance de référence.

14. Procédé selon les revendications 7 à 13, caractérisé en ce que l'analyte est une tétracycline, telle que tétracycline, oxytétracycline ou chlortétracycline.
15. Procédé selon les revendications 7 à 13, caractérisé en ce que l'analyte est, d'une part une protéine exogène du produit laitier liquide, par exemple une protéine étrangère, ou, d'autre part, une protéine endogène du produit laitier, par exemple une hormone telle que la progestérone ou l'hormone de croissance.
16. Procédé selon les revendications 7 à 13, caractérisé en ce que l'analyte est un antibiotique à noyau β -lactame.
17. Procédé selon la revendication 7 à 13, caractérisé en ce que l'analyte est choisi parmi le groupe constitué par benzylpénicilline (ou pénicilline G), ampicilline, amoxicilline, carbénicilline, méthylcilline, cloxacilline, 6-APA, monolactame, aztréoname, mécilliname, céphalexine, céphaloglycine, céphaloridine, nitrocéphine, céfatoxime, céfuroxime, ceftiofur, céphapryrine, 7-ACA.
18. Procédé selon les revendications 8 à 17, caractérisé en ce que la substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de l'analyte est choisie parmi les récepteurs capables de former un complexe stable et essentiellement irréversible avec l'analyte ou une substance analogue de l'analyte et les anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de l'analyte ou d'une substance analogue de l'analyte.
19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de l'analyte est un récepteur obtenu à partir d'un microorganisme sensible aux antibiotiques, tel que les récepteurs obtenus à partir des espèces Bacillus, Streptococcus ou Actinomycètes.
20. Procédé selon les revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que la substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de l'analyte est un récepteur sensible aux antibiotiques à noyau β -lactame obtenu à partir de Bacillus licheniformis.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le récepteur sensible aux antibiotiques à noyau β -lactame obtenu à partir de Bacillus licheniformis est le récepteur BlaR ou le récepteur BlaR-CTD.
- 5 22. Procédé de préparation d'un dispositif d'essai selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on prépare des cartes à partir du support solide (1) recouvert d'un adhésif et des membranes au moyen d'un
lamineur, que l'on dépose les solutions de capture sur la membrane (3), puis
10 que l'on découpe les cartes en lamelles, chacune de ces lamelles constituant un dispositif d'essai.
23. Trousse d'essai comprenant un dispositif d'essai selon les revendications 1 à 6.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/BE 98/00147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/558 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
E	EP 0 806 666 A (SYNTRON BIORESEARCH INC) 12 November 1997 see claims 1,8-12,15,16 see page 2, line 13 - line 53 see figures 5-7 ---	1-23
X	EP 0 408 222 A (KINGSTON DIAGNOSTICS LP) 16 January 1991 see claims see page 4, line 37 - page 5, line 47 ---	1-23
X	WO 96 15453 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 23 May 1996 see claims see page 4, line 2 - line 3 see page 5, line 4 - page 7, line 2 --- -/-	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1998

Date of mailing of the international search report

30/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/BE 98/00147

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 10177 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 4 April 1996 see claims see page 3, line 18 - page 4, line 6 see figure 1 ---	1-23
X	WO 93 18398 A (QUIDEL CORP) 16 September 1993 see claims see figure 1 see page 3, line 11 - line 28 ---	1-23
X	US 5 591 645 A (ROSENSTEIN ROBERT W) 7 January 1997 see claims see column 3, line 51 - line 59 see figure 1 ---	1-23
X	US 5 160 486 A (SCHLIPFENBACHER REINER ET AL) 3 November 1992 see claims see column 7, line 15 - column 8, line 50 see figure 2 -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. tional Application No

PCT/BE 98/00147

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0806666 A	12-11-1997	US 5821073 A JP 10010125 A	13-10-1998 16-01-1998
EP 0408222 A	16-01-1991	CA 2020029 A JP 3130662 A JP 3130663 A	13-01-1991 04-06-1991 04-06-1991
WO 9615453 A	23-05-1996	AU 3752595 A	06-06-1996
WO 9610177 A	04-04-1996	AU 3483495 A	19-04-1996
WO 9318398 A	16-09-1993	EP 0630475 A JP 7504747 T	28-12-1994 25-05-1995
US 5591645 A	07-01-1997	AT 123575 T AU 605565 B AU 1359588 A CA 1303983 A DE 3853927 D DE 3853927 T DK 168188 A EP 0284232 A ES 2074994 T FI 880764 A, B GR 3017177 T JP 1063865 A JP 7013640 B JP 10073592 A	15-06-1995 17-01-1991 29-09-1988 23-06-1992 13-07-1995 16-11-1995 28-09-1988 28-09-1988 01-10-1995 28-09-1988 30-11-1995 09-03-1989 15-02-1995 17-03-1998
US 5160486 A	03-11-1992	DE 3842702 A AU 616328 B AU 4616889 A CA 2005564 A EP 0374684 A EP 0525829 A JP 2807199 B JP 8220097 A JP 2221860 A JP 2541674 B	21-06-1990 24-10-1991 21-06-1990 19-06-1990 27-06-1990 03-02-1993 08-10-1998 30-08-1996 04-09-1990 09-10-1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/BE 98/00147

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/558 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	EP 0 806 666 A (SYNTRON BIORESEARCH INC) 12 novembre 1997 voir revendications 1,8-12,15,16 voir page 2, ligne 13 - ligne 53 voir figures 5-7 ---	1-23
X	EP 0 408 222 A (KINGSTON DIAGNOSTICS LP) 16 janvier 1991 voir revendications voir page 4, ligne 37 - page 5, ligne 47 ---	1-23
X	WO 96 15453 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 23 mai 1996 voir revendications voir page 4, ligne 2 - ligne 3 voir page 5, ligne 4 - page 7, ligne 2 ---	1-23
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/11/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Routledge, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De ... de Internationale No
PCT/BE 98/00147

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 10177 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 4 avril 1996 voir revendications voir page 3, ligne 18 - page 4, ligne 6 voir figure 1 ---	1-23
X	WO 93 18398 A (QUIDEL CORP) 16 septembre 1993 voir revendications voir figure 1 voir page 3, ligne 11 - ligne 28 ---	1-23
X	US 5 591 645 A (ROSENSTEIN ROBERT W) 7 janvier 1997 voir revendications voir colonne 3, ligne 51 - ligne 59 voir figure 1 ---	1-23
X	US 5 160 486 A (SCHLIPFENBACHER REINER ET AL) 3 novembre 1992 voir revendications voir colonne 7, ligne 15 - colonne 8, ligne 50 voir figure 2 -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Doc. de Internationale No

PCT/BE 98/00147

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0806666 A	12-11-1997	US 5821073 A JP 10010125 A	13-10-1998 16-01-1998
EP 0408222 A	16-01-1991	CA 2020029 A JP 3130662 A JP 3130663 A	13-01-1991 04-06-1991 04-06-1991
WO 9615453 A	23-05-1996	AU 3752595 A	06-06-1996
WO 9610177 A	04-04-1996	AU 3483495 A	19-04-1996
WO 9318398 A	16-09-1993	EP 0630475 A JP 7504747 T	28-12-1994 25-05-1995
US 5591645 A	07-01-1997	AT 123575 T AU 605565 B AU 1359588 A CA 1303983 A DE 3853927 D DE 3853927 T DK 168188 A EP 0284232 A ES 2074994 T FI 880764 A, B GR 3017177 T JP 1063865 A JP 7013640 B JP 10073592 A	15-06-1995 17-01-1991 29-09-1988 23-06-1992 13-07-1995 16-11-1995 28-09-1988 28-09-1988 01-10-1995 28-09-1988 30-11-1995 09-03-1989 15-02-1995 17-03-1998
US 5160486 A	03-11-1992	DE 3842702 A AU 616328 B AU 4616889 A CA 2005564 A EP 0374684 A EP 0525829 A JP 2807199 B JP 8220097 A JP 2221860 A JP 2541674 B	21-06-1990 24-10-1991 21-06-1990 19-06-1990 27-06-1990 03-02-1993 08-10-1998 30-08-1996 04-09-1990 09-10-1996

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)